

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Kiyoshi KASAI, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE-MEASURING REAGENT AND METHOD FOR
MEASURING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e). Application No. Date Filed
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

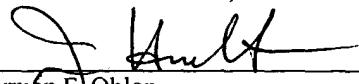
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2002-220110	July 29, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 are submitted herewith
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

James D. Hamilton
Registration No. 28,421



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月29日

出願番号

Application Number:

特願2002-220110

[ST.10/C]:

[JP2002-220110]

出願人

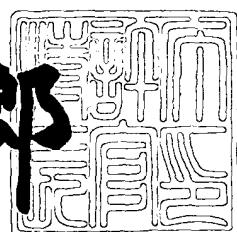
Applicant(s):

ジェイエスアール株式会社

2003年 4月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3026799

【書類名】 特許願

【整理番号】 10060

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイエスアール株式会社内

【氏名】 笠井 澄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイエスアール株式会社内

【氏名】 増川 亨

【特許出願人】

【識別番号】 000004178

【氏名又は名称】 ジェイエスアール株式会社

【代表者】 吉田 淑則

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013066

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性物質担体ポリマー粒子

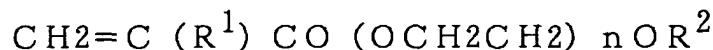
【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) カルボン酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマー 0.

1~20重量%、

(2) 下記一般式(1)で表される化合物および強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーもしくはいずれか一方 0.05~20重量%、

一般式(1)



(式中、R¹は水素原子またはメチル基を示し、R²は水素原子、C1~C6アルキル基、アルコキシフェニル基、フェニル基、アクリロイル基またはメタクリロイル基を示し、nは2~22の数を示す)

ならびに

(3) 上記(1)および(2)に記載のモノマーと共に重合可能なラジカル重合性ビニルモノマー 60~99.8重量%

をラジカル乳化重合することにより得られる化学結合感作用生理活性物質担体ポリマー粒子。

【請求項2】 強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーが、スチレンスルホン酸あるいはスチレンスルホン酸塩である請求項1の化学結合感作用生理活性物質担体ポリマー粒子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定組成のモノマーをラジカル乳化重合することにより得られる化学結合感作用生理活性物質担体ポリマー粒子、より詳しくは、抗体・抗原・酵素・ホルモン等のタンパク物質、DNA・RNA等の核酸物質あるいは生理活性糖鎖化合物（以下、これらを生理活性物質という）を粒子表面に化学結合法で感作させる生理活性物質担体ポリマー粒子に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、医学・生物学用途での担体用ポリマー粒子としては物理吸着感作用に主にポリスチレン粒子、化学結合感作用に主にカルボキシル基変性ポリスチレン粒子が広く使用されていた。

このうち、ポリスチレン粒子はタンパク等による物理吸着能力が高く、目的とする生理活性物質を容易に吸着する（感作する）ことが可能との特徴があり、広い範囲の生理活性物質に対して使用されている。しかしながら、このポリスチレン系の粒子は試験検体中に存在する目的としない他の生理活性物質等の吸着（これを非特異吸着という）が大きく、感作粒子の性能を阻害して使用する上での大きな障害になっていた。これに対して、粒子表面に目的の生理活性物質を感作したあと、残りの粒子表面をウシ血清アルブミン（BSA）等の害の少ないタンパクを先に吸着させるブロッキングの手法が用いられているが効果は完全ではなかった。ポリスチレン粒子にスチレンスルホン酸塩あるいは特定のオリゴエチレンオキシド側鎖またはオリゴプロピレンオキシド側鎖のアクリルエステルを共重合させたり、あるいは粒子の乳化重合後にアルカリ性水溶液中で加熱処理して粒子に結合した過硫酸塩系開始剤の断片を加水分解させることで生理活性物質担体粒子としての性能を向上させることができることが知られているが、充分でなかった。また、物理吸着法による感作では感作粒子の使用時あるいは経時保存中に、感作した生理活性物質の一部が脱着することがあるとの本質的な問題があった。

【0003】

一方、生理活性物質と化学結合できるカルボキシル基、アミノ基、グリシジル基等の活性官能基を粒子表面に有するポリマー粒子を用いる化学結合感作法では、生理活性物質が化学結合によって強固に粒子表面に結合されていて外れ難い、化学結合感作の際に目的とする生理活性物質のみを存在させて感作できる等の利点がある。このため、一般に化学結合感作法による感作粒子は性能の安定性に優れるが、粒子と化学結合できる生理活性物質には制限があり、適用できる対象が狭いとの制限があった。また、化学結合感作用粒子の表面はカルボキシル基、アミノ基、グリシジル基等の活性官能基が存在するために親水性が高く、疎水性の物理吸着用ポリスチレン粒子と比べて生理活性物質との親和性が低い。このため

化学結合法では感作効率が悪く、感度等の性能が低い、性能に調節の幅が狭い、高価な感作抗体が多量に必要で製造コストが高いとの問題があった。

化学結合感作でのこれらの問題に対し、粒子表面のカルボキシル基の量を極微量にして物理吸着法と化学結合法の折衷をねらう提案、粒子表面に水酸基あるいは特定構造の側鎖のアクリルエステル構造を有する粒子の提案、粒子表面に多量のエポキシ基を有する粒子の提案、粒子表面に一級アミンを有する粒子の提案、重合の初期にカルボン酸モノマー濃度の高いモノマー混合物を先に重合させることで粒子表面のカルボン酸含量を高めたカルボキシル基変性粒子を用いる提案等があるが、完全ではなかった。

【0004】

【本発明が解決しようとする課題】

本発明は、診断薬用の化学結合担体粒子として、試薬化した粒子の保存安定性および感度と感度の直線性に優れる担体粒子を得ることを目的とする。

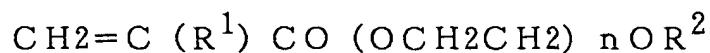
【0005】

【本発明を解決するための手段】

本発明は、(1)カルボン酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマー0.1～20重量%、

(2)下記一般式(1)で表される化合物および強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーもしくはいずれか一方0.05～20重量%、

一般式(1)



(式中、R¹は水素原子またはメチル基を示し、R²は水素原子、C1～C6アルキル基、アルコキシフェニル基、フェニル基、アクリロイル基またはメタクリロイル基を示し、nは2～22の数を示す)

ならびに

(3)上記(1)および(2)に記載のモノマーと共に重合可能なラジカル重合性ビニルモノマー60～99.8重量%

をラジカル乳化重合することにより得られる化学結合感作用生理活性物質担体ポリマー粒子を提供するものである。

【0006】

本発明において、カルボン酸基を含有するラジカル重合性ビニルモノマーとは、アクリル酸、メタクリル酸、プロピオン酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸、無水マレイン酸、2-カルボキシエチルアクリレート、2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー等の重合可能な不飽和カルボン酸である。このうち、特にアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸が好ましい。これらは複数を併用することもできる。

本発明で使用するカルボン酸基を含有するラジカル重合性ビニルモノマーの量は、全単量体に対し、0.1～20重量%、好ましくは0.5～10重量%、さらに好ましくは1～6重量%である。0.1重量%未満では生理活性物質との化学結合のための反応基が不足して化学結合感作が困難である。20重量%を超えるとモノマーの水溶性が高すぎて乳化重合での安定性が不良となり、重合凝集物が多量に発生する。

【0007】

本発明で、強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーとは、スルホン酸基あるいは硫酸エステル基を有するモノマーである。具体例としてはスチレンスルホン酸、2-スルホエチルメタクリレート、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、1-アリロキシ-2-ヒドロキシプロパンスルホネートおよびこれらのナトリウム、カリウム、アンモニウム塩が挙げられる。これらは複数を併用することができる。このうち、特にスチレンスルホン酸およびその塩が粒子の非特異吸着を下げる効果が大きく好ましい。

本発明で使用する強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーの量は、全単量体に対し、0.05～20重量%、好ましくは0.1～10重量%、さらに好ましくは0.5～6重量%である。0.05重量%未満では実質的な効果が得られない。20重量%を超えるとモノマーの水溶性が高すぎて乳化重合での安定性が不良となり、重合凝集物が多量に発生する。

【0008】

本発明において、前記一般式(1)で表されるモノマーは、ポリエチレングリコール構造の長さにより粒子表面の親水性と疎水性のバランスがよく、粒子表面

の立体障害的保護バリアの強弱を調整できる。

前記一般式(1)において、C1～C6アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基などが、アルコキシフェニル基としては、メトキシフェニル基、エトキシフェニル基、プロポキシフェニル基などが挙げられ、nは2～22で、好ましくは3～14である。

本発明において一般式(1)で表される化合物の使用量は、全单量体に対し、0.05～20重量%、好ましくは0.1～10重量%、さらに好ましくは0.2～6重量%である。0.05重量%未満では実質的な効果が得られない。20重量%を超えるとモノマーの水溶性が高すぎて乳化重合での安定性が不良となり、重合凝集物が多量に発生する。

なお、本発明において、強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーおよび一般式(1)で表される化合物を併用する場合には、両者の合計が全单量体の0.05～20重量%となるように使用する。

【0009】

本発明で、これらと共に重合可能なラジカル重合性ビニルモノマーの具体例としては、スチレン、ビニルトルエン、α-メチルスチレン、ジビニルベンゼン、ビニルナフタレン等の芳香族ビニル化合物、メチルアクリレート、メチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、t-ブチルメタクリレート、シクロヘキシルメタクリレート等のアクリレートまたはメタクリレート化合物、酢酸ビニル、ギ酸ビニル、酢酸アリル等のビニルエステル化合物、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、シアノ化ビニリデン等の重合性二重結合含有シアノ化合物、塩化ビニル、塩化ビニリデン、ビニルメチルエチルケトンビニルメチルエーテル等の前記以外の重合性二重結合化合物を挙げができる。これらのうち、生理活性物質との親和性の点で、特にスチレンが好ましい。これらは複数併用することができる。

この共重合可能なラジカル重合性ビニルモノマーの使用割合は60～99.8重量%である。

【0010】

本発明の乳化重合は定法での乳化重合が適用できる。重合開始剤は水溶性のラ

ジカル開始剤で、具体例としては過硫酸ナトリウム、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム、過酸化水素／硫酸第一鉄、クメンヒドロキシペルオキシド／アスコルビン酸、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス-2,4-ジメチルバレロニトリル等が挙げられる。これらのうち、過硫酸塩が好ましい。

本発明で使用する乳化剤は定法のものが使用できる。具体例としては、ドデシルベンゼンスルホン酸塩、ドデシル硫酸塩等の陰イオン界面活性剤が好ましい。また、用途においては、ノニオン乳化剤を使用すること、あるいはアニオン乳化剤とともにノニオン乳化剤を併用することも可能である。また、一分子中にアニオン基とノニオン基を有するアニオン／ノニオン乳化剤を使用することも可能である。

本発明では、乳化剤を使用しないで乳化重合を行うこともでき、乳化剤を使用しない、いわゆるソープフリー重合も本発明の乳化重合に含める。

ソープフリー重合では粒子径のコントロールに制限があるが、この方法で重合した粒子は表面への乳化剤の吸着がないため、生理活性物質の吸着が良好であるとの利点がある。

本発明の生理活性物質担体ポリマー粒子の粒子径は、0.03～2μmの範囲であり、好ましくは0.05～1μm、さらに好ましくは0.07～0.8μmである。

【0011】

本発明の生理活性物質担体用ポリマー粒子は、乳化重合の後、pH調整、必要があればスチームストリップ等で残留モノマーの除去を行い、透析・限外ろ過・遠心分離等で粒子表面を洗浄した上で医学生物学用途での担体粒子として使用できる。

本発明の生理活性物質担体用ポリマー粒子は、粒子表面にカルボン酸基を有しており、化学結合法による生理活性物質を結合することができる。従来のカルボン酸変性粒子と比べて生理活性物質の非特異吸着が少なく、高性能の免疫診断薬、バイオ担体粒子、核酸捕捉粒子等に利用することができる。

【0012】

本発明の生理活性物質担体用ポリマー粒子表面に化学結合法で直接にタンパク

、核酸、糖鎖物質等の生理活性物質を結合させて使用することができるが、粒子表面に二官能のスペーサ化合物の一端を結合させ、他方に生理活性物質を結合させることで生理活性物質が粒子表面から若干の距離を離すことができる。例えばエチレングリコールジグリシジルエーテルおよびその誘導体をスペーサ化合物として使用することができる。生理活性物質が粒子表面から離れることで、生理活性物質の活性が大いに向上し、均一溶液中での値に近づき、時にはそれを越えることも期待できる。

本発明の担体粒子への抗体、抗原、タンパク、核酸、糖鎖物質等の生理活性物質の感作は化学結合法で行うが、その感作法としては、従来の通常の化学結合法のプロセス（プロトコール）が適用できる。

【0013】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

なお、本実施例において%および部は重量基準である。

実施例1

1 Lの攪拌装置付き四ツ口フラスコに、水700部、ドデシルベンゼンスルホン酸ソーダ0.5部、炭酸ナトリウム0.05部、スチレン95部、アクリル酸2部、スチレンスルホン酸ナトリウム1部を入れ、窒素置換して80℃に昇温した。80℃になったところで5%過硫酸アンモニウム水溶液10部を添加して重合を開始した。そのまま80℃で6時間の重合を行なった後、冷却し、500メッシュの金網でろ過した。固体分を測定して重合転化率を計算したところ、99.7%であり、凝固物量は0.01%以下で重合安定性は良好であった。動的光散乱法で粒子径を測定したところ、125 nmであった。

この粒子は、1%水酸化ナトリウムでpHを8に調整した後、10,000rpm×30分の遠心分離で粒子を沈降させて上澄みを捨て、固体分をイオン交換水に再分散することを3回繰り返して粒子の精製を行った。

【0014】

実施例2-9、比較例1-6

使用するモノマーの種類および量を表1または表2に記載とおりとした以外は

実施例1と同様にして、実施例2-9、比較例1-6の粒子を合成した。

【0015】

【表1】

	実施例								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<モノマー組成>									
スチレン	97	96	94	85	94	79	92	94	94
アクリル酸	2	1	-	-	-	-	1	-	-
メタクリル酸	-	-	5	10	5	5	-	5	5
イタコン酸	-	2	-	-	-	-	2	-	-
フマル酸	-	-	-	1	-	-	-	-	-
スチレンスルホン酸ナト	1	1	1	5	-	1	-	-	-
リウム									
2-アクリルアミド-2-メチルプロ	-	-	-	-	1	-	-	-	-
パンスルホン酸									
メキシ(オリゴ-エチレングリコール- n=2)メタクリレート	-	-	-	-	-	15	-	-	-
メキシ(オリゴ-エチレングリコール- n=4)メタクリレート	-	-	-	-	-	-	5	-	-
メキシ(オリゴ-エチレングリコール- n=9)メタクリレート	-	-	-	-	-	-	-	1	-
メキシ(オリゴ-エチレングリコール- n=22)メタクリレート	-	-	-	-	-	-	-	-	1

【0016】

【表2】

<重合結果>	実施例								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
重合転化率(%)	99.7	99.2	99.9	99	99.2	99.8	99.8	99.4	99
重合安定性	◎	◎	◎	○	○	○△	○	○	○
粒子径(nm)	125	110	115	135	102	372	124	135	115
<感作粒子の評価結果>									
抗血清希釈倍率	2560 0	25600	12800	640 0	12800	6400	1280 0	6400 0	320
感度	◎	◎	◎	○	◎	○	◎	○	○

【0017】

【表3】

	比 較 例					
	1	2	3	4	5	6
<モノマー組成>	1	2	3	4	5	6
スチレン	100	98	98	98	73	70
アクリル酸	-	2	-	-	2	-
メタクリル酸	-	-	-	-	-	5
イタコン酸	-	-	-	-	-	-
フマル酸	-	-	-	-	-	-
スチレンスルホン酸ナトリウム	-	-	2	-	25	-
2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸	-	-	-	-	-	-
メキシ(オリゴエチレングリコール- <i>n</i> =2)メタクリレート	-	-	-	-	-	-
メキシ(オリゴエチレングリコール- <i>n</i> =4)メタクリレート	-	-	-	2	-	25
メキシ(オリゴエチレングリコール- <i>n</i> =9)メタクリレート	-	-	-	-	-	-
メキシ(オリゴエチレングリコール- <i>n</i> =22)メタクリレート	-	-	-	-	-	-

【0018】

【表4】

<重合結果>	比較例					
	1	2	3	4	5	6
重合転化率(%)	99.8	99.6	99.2	99.1	78	67
重合安定性	○	○	○	○	×	×
粒子径(nm)	120	105	135	121	150	168
<感作粒子の評価結果>						
抗血清希釈倍率	100	400	100	100	800	800
感度	×	×	×	×	×△	×△

【0019】

ラテックスの試薬化

精製した粒子をMES液(pH 6.1)に懸濁してなる1重量%の懸濁液10mlに10mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)1mlと、1mg/mlの濃度になるようにhGC抗体をMES液(pH 6.1)に添加してなるhGC抗体液10mlを添加し、室温にて3時間攪拌した。次に4℃で16,000rpm×30分の遠心分離を行ない上澄みを除去しMES液に再分散することを3回行って粒子を洗浄し、1%血清アルブミンを含有したブロッキングバッファーに懸濁して、0.1重量%のhGC感作粒子の懸濁液を作製した。

【0020】

感作粒子の評価

抗hGC抗血清との反応性を、各感作粒子について比較した。抗hGC抗血清は、100,200,400,800,1600,3200,6400,12800,25600,51200の倍率で希釈し、10段階の希釈系列を作製した。それぞれに感作粒子を添加し、粒子の凝集を認めた最大の希釈倍率を求めて評価した。結果を表1に示す。

【0021】

【発明の効果】

本発明の担体粒子を用いることで、これまでより高感度・低バックグラウンド・広測定領域のラテックス診断薬粒子、特定のDNA・RNAを捕捉、精製、濃縮する特異核酸捕捉粒子、特定のタンパク分離粒子、DNA転写制御因子タンパクの捕集粒子等を調整することができる。さらにこれら粒子をカラムに詰めると、特定の生理活性物質を検知、捕集するアフィニティクロマトができる。またこれら粒子をプレートに並べて使用することも可能である。

本発明の生理活性物質担体用ポリマー粒子の表面に医薬候補物質を結合させ、これをカラムに詰める、またはろ紙や薄層ゲルに担持させる、さらにはプレートに点着させたところに、細胞分解物あるいはタンパクを流して粒子に親和性のある成分を分別・分離することができる。これにより、医薬候補物質と相互作用する生体部位を探知することができる。あるいは逆に、本発明の生理活性物質担体用ポリマー粒子の表面に特定のタンパク、核酸、糖鎖等の生理活性物質を結合させ、これを詰めたカラム、ろ紙、薄層ゲルまたはプレートに医薬候補物質を流して粒子に親和性のある成分を分別・分離することで医薬物質をスクリーニングすることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗体・抗原・酵素・ホルモン等のタンパク物質、DNA・RNA等の核酸物質あるいは生理活性糖鎖化合物（以下、これらを生理活性物質という）を粒子表面に化学結合法で感作させる生理活性物質担体ポリマー粒子を得る。

【解決手段】 （1）カルボン酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマー0.1～20重量%、

（2）下記一般式（1）で表される化合物および強酸基を有するラジカル重合性ビニルモノマーもしくはいずれか一方0.05～20重量%、

一般式（1） $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^1)\text{CO(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OR}^2$ （式中、R¹は水素原子またはメチル基を示し、R²は水素原子、C1～C6アルキル基、アルコキシフェニル基、フェニル基、アクリロイル基またはメタクリロイル基を示し、nは2～22の数を示す）ならびに（3）上記（1）および（2）に記載のモノマーと共に重合可能なラジカル重合性ビニルモノマー40～99.8重量%をラジカル乳化重合することにより得られる化学結合感作用生理活性物質担体ポリマー粒子。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2002-220110
受付番号 50201116765
書類名 特許願
担当官 第一担当上席 0090
作成日 平成14年 7月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 7月29日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000004178]

1. 変更年月日 1997年12月10日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都中央区築地2丁目11番24号

氏 名 ジェイエスアール株式会社